

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17750

研究課題名(和文)学際的創薬化学研究：合成と活性評価について

研究課題名(英文) Interdisciplinary medicinal chemistry: Synthesis and biological evaluation

研究代表者

友原 啓介 (Tomohara, Keisuke)

九州大学・基幹教育院・助教

研究者番号：40711677

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：酵素阻害剤の結合特異性を評価するための新規手法としてのジメチルスルホキシド(DMSO)摂動法は、加水分解酵素(ヒアルロニダーゼ、ラクタマーゼ、キモトリプシン)並びに酸化還元酵素(アルドースレダクターゼ)の阻害活性評価系に適用可能であることが分かった。また、本手法において鍵となる失活状態にはないnonproductiveな酵素の存在を、蛍光、円二色性(CD)、赤外(IR)の分光分析と速度論解析によって示し、本手法の概念を立証した。また、薬用植物抽出エキスを基質としたBucherer-Bergs反応により合成した新規ヒダントイン類が、アルドースレダクターゼ阻害活性を有することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

創薬シーズの探索研究においては、標的タンパク質のリガンド結合部位に対して真に特異的に結合する新規シーズを創製することが重要である。本研究では、新規シーズ分子の新規供給法を開発するとともに、酵素阻害剤の酵素活性部位特異性を評価するための新規手法としてのDMSO摂動法を開発した。DMSO摂動法の学術的意義は、主としてタンパク質の構造解析に用いられる“摂動”の概念を、タンパク質と有機分子の分子間結合様式の解析研究に初めて適用した点にある。DMSO摂動法は、関連する既知法とは異なる作動機構を有するため、既知法を補完する代替法として広範な評価系への利用が見込まれる。

研究成果の概要(英文)：The present study developed and established a novel DMSO-perturbing assay to identify promiscuous enzyme inhibitors. The assay successfully identified nonspecific binding inhibitors of hyaluronidase, -lactamase, -chymotrypsin, and aldose reductase, typically by the attenuation of inhibitory activity by the influence of DMSO-addition. This attenuation would be attributed to the nonspecific binding property of inhibitors toward both productive and nonproductive (nondenatured) states of enzymes in perturbation solution. This working hypothesis was supported by spectroscopic analyses of enzyme conformations as well as kinetic analyses. Overall, these results provided a novel concept of the DMSO-perturbing assay. Furthermore, we have discovered novel inhibitors of aldose reductase from chemically-engineered extracts of natural products.

研究分野：創薬化学

キーワード：多成分系の分子変換 天然物様化合物 ジメチルスルホキシド 摂動効果 非特異的阻害 酵素阻害剤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

天然物に起源を有する有機化合物は構造的複雑性と多様性を有しており、創薬シーズ分子の探索研究の起点として中心的な役割を果たしてきた。天然物化学研究は、新規天然有機分子の探索を可能とするが、新規化合物の発見は天然資源に依存的で有限である。合成化学研究は自在な分子設計と合成を可能とするが、天然有機化合物に見られる複雑性と多様性を有する化合物ライブラリーの構築は困難な場合も多い。これらの理由により、両手法に捉われない新規創薬シーズ分子の合成手法の開発が求められていた。

創薬化学研究の初期生物活性スクリーニングにおいては、非特異的な分子間相互作用による偽陽性 (false positive) を排除することが求められている。偽陽性の例として、(1) タンパク質に対する非特異的結合形成やアッセイ結果に対する干渉作用、(2) アグリゲーション形成によるタンパク質に対する非特異的吸着などが知られている。前者は経験則 (PAINS など) により、後者は界面活性剤添加による活性低下によりそれぞれ見極めることができるとされている。また、古典的な速度論解析や、熱力学的あるいは物理化学的手法によっても分子間相互作用様式を評価できるが、これらの手法では説明できない事例 (偽陽性と疑われるもの) も多く存在することから、新規評価手法の開発が求められていた。

2. 研究の目的

本研究課題では、「多成分系を基質とした合成反応による新規天然物様化合物の一挙創製研究 (合成)」と「ジメチルスルホキシド (DMSO) 摂動効果を利用した分子間相互作用解析研究 (活性評価)」の二つの研究課題に取り組むこととした。前者では、天然物化学と有機化学の学際的研究課題として、天然物抽出エキスそのものを基質とした合成反応による天然物様化合物の一挙合成を目指した。後者では、生化学と有機化学の学際的研究課題として、DMSO 摂動効果を利用した酵素と酵素阻害剤の分子間相互作用解析法の一般性と適用範囲の検証、及び速度論的、熱力学的解析により、DMSO 摂動法の作動機構の考察を行い、本手法を新規分子間相互作用解析法として確立することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 多成分系を基質とした合成反応による新規天然物様化合物の一挙創製研究

各種薬用植物の抽出エキスを調製し、その成分組成について定性・定量分析を行い、最適基質を選定した。モデル基質を用いた単純な反応系を用いて、最適反応条件を構築した。次に、最適反応条件下で、薬用植物抽出エキスそのものを基質とした合成反応を実施し、粗生成物をカラムクロマトグラフィーにより単離・精製し、得られた生成物の構造決定と活性評価を行った。

(2) DMSO 摂動効果を利用した分子間相互作用解析研究

研究情報が充実している酵素 (α -chymotrypsin と β -lactamase) を研究題材として選択し、DMSO 摂動法の一般性と適用範囲を検証した。また、DMSO 摂動条件下、蛍光、円二色性 (CD)、赤外 (IR) の各種分光分析法及び速度論解析を行い、摂動法の作動機構を検証した。

4. 研究成果

(1) 多成分系を基質とした合成反応による新規天然物様化合物の一挙創製研究

薬用植物「ガジュツ」「ボタンビ」「ショウキョウ」の酢酸エチル抽出エキスを基質とした Bucherer-Bergs 反応により四置換炭素含有新規ヒダントイン類の一挙合成を行い、それらのアルドースレダクターゼ活性を評価した。その結果、中程度の阻害活性 ($IC_{50} = 40.6 \sim 295 \mu M$) を有する新規アルドースレダクターゼ阻害剤を創出することができた。

次に、薬用植物抽出エキスを基質とした Ugi 四成分連続反応による新規天然物様化合物の合成研究を行った。初めに、モデル化合物を用いて反応条件を精査・最適化した。次に、薬用植物「サンショウ」のメタノール抽出エキスを調製し、これをアルデヒド源とする Ugi 反応を試みた。その結果、エキス中のシトロネラルと、別途添加した酢酸、ベンジルアミン、トシルメチルイソシアニドの4成分から成る Ugi 付加体を得ることができた。本結果を受けて現在は、抽出エキス中の複数の成分が反応して同一分子内に組み込まれたハイブリッド型天然物様化合物の一斉合成研究に取り組んでいる。

(2) DMSO 摂動効果を利用した分子間相互作用解析研究

当研究室ではこれまでに、DMSO 摂動条件下の *in vitro* ヒアルロニダーゼ阻害評価系において、DMSO 濃度依存的なヒアルロニダーゼ阻害剤の阻害活性の低下により、酵素活性部位に対して非特異的な阻害剤を見極めることができる新規分子間相互作用解析法を開発した。本研究では、DMSO 摂動法の一般性と適用範囲を検証した。Frequent hitter として知られる構造的に多様な 18 種類の評価化合物を選定し、それぞれの化合物について、DMSO 摂動条件下、 β -lactamase (*Enterobacter cloacae* 及び *Bacillus cereus* 569/H9 由来) 並びに α -chymotrypsin に対する阻害作用を評価した。結果の一例として、quercetin は β -lactamase (*E. cloacae*) に対して阻害作用を示したが、DMSO 摂動条件下で阻害活性が低下し、活性部位非特異的な阻害剤としての挙動を示した。一方、陽性対照として用いた基質類似の阻害剤 (penicillin G など) は DMSO 摂動条件下でも一定の阻害活性を示し、活性部位特異的な阻害剤の挙動であった。さらに、当研究室で別途開発した

α -chymotrypsin 阻害剤 D-Leu-Phe-NH-Bzl(pF) ($K_i = 0.61 \mu\text{M}$) もまた、DMSO 摂動条件下で一定の阻害活性を示した。これらの結果より、DMSO 摂動法はヒアルロニダーゼ阻害活性評価系に加えて β -lactamase や α -chymotrypsin の阻害活性評価系にも適用可能であることが示され、本法の一般性が示された。また、(1)の研究により得られた新規のヒダントイン類のアルドースレダクターゼ阻害活性の特異性評価を実施し、DMSO 摂動法が酸化還元酵素にも適用可能であることを示した。

DMSO 摂動法においては、DMSO 摂動条件下で生じる失活状態にない non-productive な酵素の存在が重要であると考察している。本作業仮説を検証することを目的として、DMSO 摂動条件下における速度論解析を実施した。その結果、評価系中の DMSO 濃度が高くなるにつれて、酵素 (ヒアルロニダーゼ) の最大反応速度 (V_{max}) は低下したが、ミカエリス定数 (K_M) は変化しないことが分かった。また、同条件下において、酵素 (ヒアルロニダーゼ、 α -キモトリプシン) のトリプトファン残基に由来する蛍光スペクトル、 α -キモトリプシンのトリプトファンとチロシン残基に由来する円二色性 (CD) スペクトル、及び主鎖アミドカルボニル基の赤外 (IR) スペクトルを測定したところ、いずれのスペクトルの挙動にも変化は見られなかった。以上のことから、DMSO は酵素とランダムに相互作用することで触媒活性に摂動を与えるものの酵素の全体立体構造には変化を与えないことが明らかとなり、本法において鍵となる non-productive な酵素種の存在を実験的に示唆することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Keisuke Tomohara, Isao Adachi, Yoshikazu Horino, Hitoshi Kesamaru, Hitoshi Abe, Keitaro Suyama, Takeru Nose.	4. 巻 10
2. 論文標題 DMSO-perturbing assay for identifying promiscuous enzyme inhibitors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 923-928
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.9b00093	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Keisuke Tomohara, Naoto Hasegawa, Isao Adachi, Yoshikazu Horino, Takeru Nose.	4. 巻 30
2. 論文標題 Early identification of promiscuous attributes of aldose reductase inhibitors using a DMSO-perturbation assay	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.126815	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tomohara Keisuke, Ito Tomohiro, Furusawa Kota, Hasegawa Naoto, Tsuge Kiyoshi, Kato Atsushi, Adachi Isao	4. 巻 58
2. 論文標題 Multiple production of , -disubstituted amino acid derivatives through direct chemical derivatization of natural plant extracts: An apparently difficult but successful route	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Tetrahedron Letters	6. 最初と最後の頁 3143 ~ 3147
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tetlet.2017.06.087	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Horino Yoshikazu, Sugata Miki, Mitsuura Itaru, Tomohara Keisuke, Abe Hitoshi	4. 巻 19
2. 論文標題 Controllable Stereoselective Synthesis of (Z)- and (E)-Homoallylic Alcohols Using a Palladium-Catalyzed Three-Component Reaction	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 5968 ~ 5971
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.orglett.7b02979	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 大橋奈央、友原啓介、野瀬健
2. 発表標題 溶媒摂動効果を利用した酵素阻害剤の特異性評価
3. 学会等名 第36回日本薬学会九州支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 友原啓介、大橋奈央、栗木暖佳、崇山慶太郎、野瀬健
2. 発表標題 溶媒摂動効果を利用した初期スクリーニングヒットのバリデーション
3. 学会等名 第37回メディシナルケミストリーシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naoki Sakamoto, Daiki Tatsubo, Keiji Sato, Keisuke Tomohara, Keitaro Suyama, Iori Maeda, Takeru Nose.
2. 発表標題 Development of liposome-like nanostructures composed of short amphiphilic elastin-like peptides
3. 学会等名 第56回ペプチド討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 友原啓介、足立伊佐雄、袈裟丸仁志、野瀬健
2. 発表標題 DMSO添加条件下における酵素阻害剤の活性部位特異性評価
3. 学会等名 平成30年度日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Keisuke Tomohara
2. 発表標題 DMSO-perturbing assay for identifying promiscuous enzyme inhibitors.
3. 学会等名 The Third International Symposium on Toyama-Asia-Africa Pharmaceutical Network (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Keisuke Tomohara, Isao Adachi, Hitoshi Kesamaru, Takeru Nose
2. 発表標題 Mechanistic Characterization of alpha-Chymotrypsin Inhibitors by DMSO-Perturbing Assay
3. 学会等名 10th International Peptide Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 友原啓介、長谷川直人、足立伊佐雄、野瀬健
2. 発表標題 DMSO摂動法を用いたアルドースレダクターゼ阻害剤の活性部位特異性評価
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 友原啓介, 足立伊佐雄
2. 発表標題 DMSO摂動効果を利用した酵素阻害剤の分子間相互作用解析
3. 学会等名 創薬懇話会2017 in 加賀
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 友原啓介, 袈裟丸仁志, 足立伊佐雄, 巢山慶太郎, 野瀬健
2. 発表標題 DMSO摂動効果を利用した酵素阻害剤の活性部位特異性評価
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----